

# ***Arthrospira platensis* FILTRADA COMO ALIMENTO COMPLEMENTARIO DE JUVENILES DEL CAMARÓN BLANCO: EFECTOS SOBRE CRECIMIENTO Y SISTEMA INMUNE\***

Joaquín MACIAS-SANCHO<sup>1</sup>, Mariana HOLANDA<sup>1</sup>, Luis Alberto ROMANO<sup>2</sup>,  
Wilson WASIELESKY<sup>3</sup>, Marcelo Borges TESSER<sup>3</sup>, Luís Henrique POERSCH<sup>3</sup>

## **RESUMEN**

De forma general, las microalgas son fuente de alimento indispensable durante las primeras fases de desarrollo de los camarones marinos. Algunas microalgas, como la *Arthrospira platensis*, son ricas en sustancias antioxidantes, y tienen la capacidad de retirar compuestos tóxicos del agua en los sistemas de producción acuícola. De este modo, constituimos un experimento con dos tratamientos triplicados, donde se evaluó la aplicación de biomasa filtrada de microalga *A. platensis* como suplemento alimenticio para camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*. Se utilizó un sistema de cultivo estático de seis unidades, con volumen útil de 250 litros de agua marina (30 ppt), donde se sembraron 300 camarones m<sup>2</sup> con peso inicial de 0,7±0,2 g. Al final del experimento (42 días) se evaluaron parámetros inmunológicos y de desempeño zootécnico. Los camarones alimentados con *A. platensis* como suplemento fueron significativamente mayores que los camarones del tratamiento control y no presentaron diferencias en la supervivencia. Igualmente, se obtuvieron mejores resultados en los parámetros inmunológicos del tratamiento con inclusión de microalga. De esta forma, al suministrar la microalga como alimento suplementario al camarón *L. vannamei*, crecimiento y sistema inmunológico se vieron favorecidos.

**Palabras clave:** desarrollo; inmunoestimulante; nutrición; suplemento; Spirulina.

## **FILTERED *Arthrospira platensis* AS A FOOD SUPPLEMENT FOR JUVENILE SHRIMP *Litopenaeus vannamei*: EFFECTS ON GROWTH AND IMMUNE SYSTEM**

### **ABSTRACT**

Microalgae is an important food source during the early stages of marine shrimps. Some microalgae such as *Arthrospira platensis*, are rich in antioxidant substances and also have the capacity to remove toxic compounds from the water in aquaculture systems. The trial consisted in two treatments by triplicate, where the inclusion of filtered microalgae *A. platensis* as feed supplementation during production of juvenile *Litopenaeus vannamei*, was assessed. The experimental design was based on a static system with six 250-L tanks with marine water (30 PSU), stocked 105 shrimps (300 shrimp m<sup>2</sup>) with an average weight of 0,7 ±0,2 g. At the end of the fed trial (42 days), the zootechnical and immunological parameters of shrimps were evaluated. Significant differences among the treatments were found for both parameters. Shrimps that received supplementation of microalgae *A. platensis* showed higher growth and better response of the immune system. Thus, these results allow to conclude that the supplementation of filtered microalgae *A. platensis* improve growth and immunological parameters of white shrimp *L. vannamei*.

**Key words:** growth; immunology; nutrition; supply; Spirulina.

---

**Artigo Científico:** Recebido em 24/06/2017; **Aprovado em** 30/10/2017

<sup>1</sup> Mestre em Aquicultura pela Universidade Federal de Rio Grande, Instituto Oceanográfico, FURG-IO, Av. Itália km 8, Rio Grande, RS, Cx.P. 474, CEP 96.200-970, Brasil. E-mail: joaquinmaciassancho@gmail.com (autor correspondente)

<sup>2</sup> Departamento de Patologia de Organismos Aquáticos/LIPOA, Instituto Oceanográfico Universidade Federal de Rio Grande- FURG-IO, Grande-Rio - RS-Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Aquicultura, Instituto Oceanográfico Universidade Federal de Rio Grande- FURG-IO, Grande-Rio - RS-Brasil

\* Apoio financeiro: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## INTRODUCCIÓN

Los juveniles de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (*L. vannamei*) tienen la capacidad de filtrar, ingerir y digerir microalgas suspendidas en la columna de agua (GAMBOA-DELGADO *et al.*, 2014). Esta característica de su hábito alimenticio permite incluir las microalgas como alimento en sistemas de producción de estos crustáceos. GE *et al.* (2015) realizaron un co-cultivo de tres tipos de microalgas (*Platymonas helgolandica*, *Chlorella vulgaris* y *Chaetoceros mulleri*) con *L. vannamei* manteniendo la calidad del agua del sistema y mejorando el desempeño zootécnico de los camarones. Las tres microalgas mencionadas son de menor tamaño y con morfología celular diferente que la *Arthrospira platensis* (*A. platensis*), la cual pertenece al grupo de filamentosas, lo que según UTHAYAKUMAR *et al.* (2015), le proporciona alta flotabilidad permitiendo que se encuentre durante más tiempo disponible como alimento en la columna de agua.

Debido a su alto contenido protéico y potencial antioxidante, las técnicas de producción de *A. platensis* han llegado a ser dominadas, lo que permite que la misma pueda ser considerada como alimento alternativo con alto potencial para la acuicultura (BELAY *et al.*, 1996) y humanos (DALLE ZOTE *et al.*, 2014). CHUNTAPA *et al.* (2003) observaron que utilizar la microalga *A. platensis*, en el mismo tanque de producción de camarón blanco, permite mantener en niveles aceptables los parámetros de calidad de agua para la producción de *L. vannamei*. Esta especie de microalga se puede beneficiar de los compuestos nitrogenados acumulados en efluentes de sistemas de producción de organismos acuáticos, resultando como alternativa para la retirada de productos nitrogenados acumulados en los sistemas de co-producción de camarones marinos y microalgas (SOMBATJINDA *et al.*, 2014). El conocimiento de la capacidad de *A. platensis* para el mantenimiento de la calidad de agua (CHUNTAPA *et al.*, 2003; SOMBATJINDA *et al.*, 2014), la capacidad del camarón blanco de alimentarse de microalgas en la columna de agua (GAMBOA-DELGADO *et al.*, 2014) y el efecto positivo de las macroalgas, como *Ulva* sp. en la reutilización de compuestos nitrogenados (CRUZ-SUAREZ *et al.*, 2010; PEÑA-RODRIGUEZ *et al.*, 2010; GE *et al.*, 2015 y PALLAORO *et al.*, 2016), lleva a pensar que la co-producción de microalgas y macroalgas con camarones sea posible. Además de los beneficios en la calidad del agua en del sistema de producción,

también se destaca la mejora del sistema inmunológico del camarón blanco cuando se alimenta con *A. platensis* seca (MACIAS-SANCHO *et al.*, 2014).

Desde otro punto de vista, se conoce que el sistema inmunológico de los camarones se rige en gran parte, por la acción que ejercen los hemocitos contra los organismos patógenos. De esta manera, una disminución en el número de hemocitos en el sistema circulatorio puede indicar que la capacidad inmune se ha visto comprometida, incrementando su susceptibilidad a organismos patógenos, lo que puede afectar la tasa de sobrevivencia (LORENZON *et al.*, 1999; CHENG *et al.*, 2005; RODRÍGUEZ-RAMOS *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2013). Experimentos recientes confirman que el uso de alimentos naturales en dietas de *L. vannamei* mejora su respuesta inmunológica (ZHANG *et al.*, 2010; MACIAS-SANCHO *et al.*, 2014; ANAND *et al.*, 2015). De esta forma, se cree que ofertar *A. platensis* filtrada, como alimento suplementario en los estanques puede contribuir en el crecimiento y en la mejora del sistema inmunológico de los organismos producidos.

Considerando los resultados positivos observados por otros investigadores, en términos de calidad de agua, crecimiento y mejoría del sistema inmunológico de *L. vannamei*, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto producido por la inclusión de microalga *A. platensis* filtrada sobre el desarrollo y los parámetros inmunológicos del camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* en sistemas súper intensivos de producción.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Producción de camarones*

El presente estudio se llevó a cabo en la estación marina de acuicultura de la Universidad Federal de Rio Grande, RS-Brasil durante 42 días. Se utilizaron seis tanques plásticos con volumen útil de 250 litros y área de 0,35m<sup>2</sup> independientes entre si, formando un sistema estático de agua clara con renovaciones diarias de 35%. Se distribuyeron aleatoriamente 105 camarones *L. vannamei* por cada tanque con peso inicial medio de 0,7 ± 0,2g, resultando de esta forma una densidad de 300 camarones m<sup>-2</sup>. Los dos tratamientos comparados durante el ensayo tuvieron como única diferencia el suplemento o no de la microalga *A. platensis* como alimento. Se utilizó agua marina con salinidad de 30, previamente filtrada en filtros de 25, 5 y 1 µm, clorada con hipoclorito de sodio a 15 ppm y tratada con ácido ascórbico

(1 ppm); posteriormente fue tratada con EDTA (20 ppm). Durante el experimento se almacenó agua tratada en tanques de 10.000 L, de la misma manera descrita anteriormente, y mantenida a 27 °C para su posterior uso en las renovaciones diarias de agua del sistema experimental.

#### *Parámetros fisicoquímicos del agua*

Temperatura, pH y oxígeno disuelto fueron medidos dos veces al día con una sonda multi parámetros YSI® modelo 556. La salinidad fue medida dos veces a la semana con refractómetro. Las concentraciones de amonio, nitrito, nitrato y fosfato fueron determinadas por las metodologías descritas por la UNESCO (1983), BENDSCHNEIDER y ROBINSON (1952) y AMINOT y CHAUSSEPIED (1983), respectivamente.

El amonio fue medido diariamente, mientras que nitrito, nitrato y fosfato fueron evaluados dos veces por semana a lo largo de los 42 días. La alcalinidad fue medida también dos veces por semana según la metodología de APHA (1998) y su valor fue mantenido arriba de 100 mg L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>, el cual es necesario para el desarrollo de camarón (FURTADO *et al.*, 2011). Se trabajó bajo fotoperiodo de 12 horas luz-12 horas oscuridad. Diariamente, se recambió por sifonado el 35% del volumen de agua de cada tanque para evitar la acumulación de heces, mudas y materia orgánica.

#### *Fuentes de alimentación*

En el transcurso del experimento, los camarones de los dos tratamientos fueron mantenidos con balanceado comercial (J40 Guabi®, Brasil), y un único tratamiento además recibía filtrado de microalga *A. platensis* como suplemento alimenticio.

La cepa de *A. platensis* se obtuvo del Laboratorio de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Federal de Rio Grande (LEB-FURG). La microalga utilizada durante este ensayo se cultivó en tanques cilíndricos de 250 L de volumen útil, en medio f/2 modificado de Guillard (1975) en la Estación Marina de Acuicultura de la Universidad Federal de Rio Grande (EMA/FURG). El medio de cultivo utilizado para la producción de microalga se componía de agua de mar, filtrada por filtro CUNO® (1 mm de poro), tratada con 0,15 mL L<sup>-1</sup> de hipoclorito de sodio al 5% y neutralizada con 0,04 g L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico.

La solución patrón para el cultivo estaba

compuesta por: 150 g L<sup>-1</sup> de NaNO<sub>3</sub>, 8 g L<sup>-1</sup> de FeC<sub>13</sub>, 9 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>EDTA y 1 mL L<sup>-1</sup> de solución metálica (5 mg L<sup>-1</sup> de CoC<sub>12</sub>; 9 mg L<sup>-1</sup> de ZnC<sub>12</sub>; 100 mg L<sup>-1</sup> de MnC<sub>12</sub>; 6 mg L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub> y 3 mg L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>) más otra solución de fosfato (9 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 1 g L<sup>-1</sup> de vitamina B<sub>12</sub>). La solución patrón se obtuvo de mezclar 1 mL L<sup>-1</sup> de cada una de las soluciones descritas e incluidas *a posteriori* en el medio de cultivo. La producción de microalgas se realizó a una salinidad de 30, pH 8.0, 30°C, intensidad luminosa de 1500 lux, fotoperiodo de 24h luz, aireación constante hasta la densidad de cultivo de 2,5 x 10<sup>6</sup> cel L<sup>-1</sup>.

Los análisis de composición proximal del balanceado y de la microalga *A. platensis* fueron realizados de acuerdo con la metodología propuesta por AOAC (2000), en el laboratorio de nutrición de organismos acuáticos (LANOA) de la FURG.

#### *Alimentación*

La alimentación de los camarones de todos los tanques fue realizada con balanceado comercial dos veces al día (8:00 y 18:00). Durante el transcurso del experimento se realizaron biometrías semanales para determinar la biomasa de cada tanque y así ajustar la cantidad de alimento balanceado que debía ser suministrado de acuerdo JORY *et al.* (2001).

La cantidad de microalga utilizada estuvo de acuerdo con lo sugerido por CHUNTAPA *et al.* (2003), 4x10<sup>6</sup> cel L<sup>-1</sup>, y de GHARIBI *et al.* (2015), 9x10<sup>7</sup> cel L<sup>-1</sup>, al principio y final del experimento respectivamente. La cantidad de microalga suministrada en un tratamiento era compensada en el tratamiento sin suplemento de microalga adicionando el 1% más de alimento que lo establecido por JORY *et al.* (2001).

A partir del decimoquinto día se llevó a cabo el aumento de densidad de microalga para poder ajustar la oferta con el tamaño de los camarones y el uso del exceso de compuestos nitrogenados por parte de las microalgas presentes en los sistemas de producción. Con cada renovación parcial de agua se calculaba la densidad de microalga residual de cada estanque por medio de conteos, de esta forma se estimaba la concentración de microalga necesaria para alcanzar las densidades de microalga indicadas anteriormente en cada una de las unidades experimentales.

La concentración de microalga necesaria fue obtenida tras el filtrado de un volumen conocido de medio de cultivo en malla de 20µm para ser luego adicionado en los tanques correspondientes.

### *Indicadores de Crecimiento de los Camarones*

Para evaluar el crecimiento de los animales al final del período experimental se analizaron los siguientes parámetros: Peso ganado por semana= (peso final (g)/ tiempo de experimento [semanas]); Tasa de conversión de alimento= alimento seco total suministrado (g) / peso húmedo ganado (g); Tasa de crecimiento específico=  $(100 \times [\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}] / \text{ tiempo de experimento [días]})$ ; Supervivencia % =  $(100 \times [\text{ número final de camarones} / \text{ número inicial de camarones}])$ .

Un total de 60 organismos (10 por unidad experimental) se colectaron al final del experimento para la realización de análisis de composición proximal del músculo realizado en el LANOA de la FURG. La concentración de proteínas, extracto etéreo, cenizas y humedad del músculo fueron calculados según el protocolo de la AOAC (2000).

### *Estudio del sistema inmunológico de *L. vannamei**

Al final del experimento, 5 camarones por unidad experimental fueron colectados para la extracción de hemolinfa y posterior realización de los diferentes análisis del sistema inmune de los camarones. La hemolinfa (aproximadamente 45  $\mu\text{L}$  totales por cada camarón) fue retirada por inyección seno ventral, 15  $\mu\text{L}$  de hemolinfa por tratamiento se utilizaron para la cuantificación de hemocitos según la técnica de May-Grunwald-Giemsa. Este análisis se llevó a cabo con ocular de integración de 5 líneas y 25 puntos (Carl Zeiss) según WEIBEL (1980). Otros 15  $\mu\text{L}$  de hemolinfa fueron utilizados para determinar la concentración de proteínas totales por el método descrito por BRADFORD (1976).

Una alícuota de 5  $\mu\text{L}$  de hemolinfa por camarón fue empleada para la preparación de 5 esfregazos en lámina posituada por tratamiento. En estas láminas se aplicó el kit ApopTag® Peroxidase In situ (Millipore) "TUNEL REACTION", de acuerdo con lo descrito por CHARRIAUT-MARLANGUE y BENARI (1995) y WANG y ZHANG (2008).

### *Análisis estadísticos*

Se realizaron análisis de varianza de una vía (ANOVA) para evaluar el efecto de suplementar el filtrado de microalga *Arthrospira platensis* en el crecimiento e inmunología de *Litopenaeus*

*vannamei*, todos los datos cumplieron las premisas de normalidad del test de Kolmogorov-Smirnov y homocetasticidad del test de Levene. Posteriormente se aplicó el test de Newman-Keuls para confirmar la existencia de diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos.

## RESULTADOS

### *Parámetros fisicoquímicos del agua*

Durante el desarrollo del experimento los dos tratamientos mantuvieron registros de salinidad de 30, temperatura media de 27°C, concentración de oxígeno disuelto de 4,8  $\text{mg L}^{-1}$  y pH medio de 7,85. Los valores de temperatura, oxígeno disuelto, pH amonio, nitrito, nitrato y fosfato no presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos, estos valores están expresados en la Tabla 1.

### *Composición proximal de las fuentes de alimentación*

Los valores de la composición proximal de alimentos ofertados están expresados en la Tabla 2.

### *Datos zootécnicos*

Los resultados de los parámetros zootécnicos obtenidos al final del experimento están indicados en la Tabla 3. Se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos, con un mayor peso final en el tratamiento suplementado con *A. platensis*. También, fueron observadas diferencias significativas entre los tratamientos en el crecimiento semanal y la tasa de crecimiento específico, resultando valores mayores en el tratamiento que recibía *A. platensis*. La supervivencia fue superior al 98% en todos los tratamientos.

Los resultados de composición proximal del músculo de los camarones están representados en la Tabla 4. Los camarones del tratamiento suplementado con *A. platensis* presentaron concentraciones significativamente mayores de proteína muscular respecto a los camarones del tratamiento en el que no se suplementó. Contrariamente, las concentraciones de extracto etéreo musculares fueron mayores para los animales que no recibieron microalga como alimento suplementario.

### *Resultados de parámetros inmunológicos*

Los resultados de los parámetros inmunológicos

obtenidos al final del experimento están expresados en la Tabla 5. La concentración de proteínas de la hemolinfa fue estadísticamente superior en los camarones alimentados con *A. platensis*. Los hemocitos granulados fueron más abundantes en los organismos que recibieron *A. platensis*, mientras

que los hemocitos hialinos fueron más abundantes en los camarones que no la recibieron. El índice de apoptosis también presentó diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, obteniendo mayores valores en el tratamiento que tuvo *A. platensis* como suplemento alimenticio.

**Tabla 1 .** Parámetros fisicoquímicos del agua obtenidos en 42 días de experimento, representados como valores medios  $\pm$  desviación estandar (n=3). Balanceado: dieta comercial; Apsup: balanceado comercial más suplemento de *A. platensis* filtrada

	Balanceado	Apsup
T(°C)	29,75 $\pm$ 1,88 <sup>a</sup>	29,50 $\pm$ 1,98 <sup>a</sup>
pH	7,82 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	7,92 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>
D.O(mg L <sup>-1</sup> )	4,80 $\pm$ 0,56 <sup>a</sup>	4,75 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup>
[NH <sup>4+</sup> ](mg L <sup>-1</sup> )	3,91 $\pm$ 2,21 <sup>a</sup>	5,10 $\pm$ 2,86 <sup>a</sup>
[NO <sup>2-</sup> ](mg L <sup>-1</sup> )	0,08 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	0,08 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>
[NO <sup>3-</sup> ](mg L <sup>-1</sup> )	0,02 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,03 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
[PO <sup>4-</sup> ](mg L <sup>-1</sup> )	0,84 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	1,09 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup>

**Tabla 2 .** Composición proximal de alimentos (g 100 g<sup>-1</sup> en base seca) ofertados (n=6).

Alimentos	Proteínas (%)	Cenizas (%)	Lípidos (%)	Humedad (%)
Balanceado	39,8 $\pm$ 0,35	12,11 $\pm$ 0,59	9,13 $\pm$ 0,04	6,28 $\pm$ 0,02
A.platensis	65,3 $\pm$ 0,24	4,97 $\pm$ 0,21	2,92 $\pm$ 0,95	88,48 $\pm$ 0,05

**Tabla 3 .** Valores medios  $\pm$  desviación estándar (n=3) de los parámetros zootécnicos al final de 42 días de experimento. TRAT: tratamiento; Balanceado: alimentado con dieta comercial; Apsup: balanceado más *A. platensis* filtrada; PF: peso final (gramos); GPS: ganancia de peso semanal; FCA: Factor de conversión alimenticia; TCE: Tasa de crecimiento específico; SB: sobrevivencia. Letras diferentes en la vertical indican diferencias significativas.

TRAT	Balanceado	Apsup
PF(g)	6,01 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	6,75 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>
GPS	1,20 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	1,35 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>
FCA	1,12 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	1,06 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
TCE	4,82 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	5,00 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>
SB (%)	98,09 $\pm$ 0,95 <sup>a</sup>	99,05 $\pm$ 0,95 <sup>a</sup>

**Tabla 4 .** Composición proximal del músculo de *Litopenaeus vannamei*, Balanceado: alimentado con dieta comercial, Apsup: balanceado más *A. platensis* (n=6, materia húmeda- peso  $\pm$  desviación estándar). Letras diferentes en la vertical indican diferencias significativas.

TRAT	Balanceado	ApSup
Proteína (%)	18,98 $\pm$ 0,40 <sup>b</sup>	19,71 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>
Cenizas (%)	1,76 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	1,83 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>
Lípidos (%)	3,96 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>	3,22 $\pm$ 0,27 <sup>b</sup>
Humedad (%)	76,61 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	76,16 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>

**Tabla 5 .** TPC: Concentración de proteínas totales; Hg: porcentajes de hemocitos granulados; Hh: porcentajes de hemocitos hialinos; Apoptosis: porcentaje de apoptosis celular en la hemolinfa de camarones. Letras diferentes en la vertical indican diferencias significativas.

TRAT	Balancedo	Apsup
TPC (mg mL <sup>-1</sup> )	120,13±2,47 <sup>b</sup>	129,53±3,27 <sup>a</sup>
Hg (%)	65,40±2,92 <sup>b</sup>	76,00±2,97 <sup>a</sup>
Hh (%)	34,60±2,92 <sup>a</sup>	24,60±2,97 <sup>b</sup>
Apoptosis (%)	0,95±0,82 <sup>b</sup>	3,35±1,35 <sup>a</sup>

## DISCUSIÓN

Los análisis de calidad del agua mostraron que hubo un aumento en la concentración de compuestos nitrogenados disueltos durante el experimento, probablemente debido a la alta densidad de camarones por unidad experimental (300 cam m<sup>2</sup>), degradación del alimento balanceado, excreción de los camarones y muerte de la microalga en los tanques donde fue suministrada como suplemento alimenticio. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los tratamientos en los valores de dichos compuestos. Durante el periodo experimental se alcanzaron concentraciones de amonio de hasta 11 mg NH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup> para el tratamiento con suplemento de microalga filtrada, y valores de 8,8 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup> L<sup>-1</sup> en el tratamiento sin inclusión de la microalga. Estos valores fueron más altos que los obtenidos por GE *et al.* (2015), donde diferentes microalgas crecieron utilizando amonio y nitrito acumulado en el sistema de coproducción con camarón blanco. Cabe destacar que los valores de amonio en el agua de los tanques de producción fueron mayores a los valores recomendados por VAN WYK y SCARPA (1999), probablemente por la alta mortalidad de la microalga, en consecuencia, incrementó la concentración de nitrógeno total en el agua de los estanques. Aún con estos altos valores de amonio, no ocurrieron altas tasas de mortalidad debido a las renovaciones diarias de agua.

Los resultados de crecimiento en los diferentes tratamientos pueden ser efecto directo de suplementar *A. platensis* filtrada. Estos resultados coinciden con los obtenidos por CHUNTAPA *et al.* (2003) y SOMBATJINDA *et al.* (2014) en sistemas de coproducción de camarón blanco y microalga, también conocidos como sistemas de producción en agua verde. La utilización de micro y macro algas dentro de sistemas de producción de especies acuáticas puede favorecer el desempeño de las

mismas, ya que algunas especies acuáticas tienen la capacidad de consumir los organismos vegetales marinos, y así disminuir los costes de producción (SÁNCHEZ *et al.*, 2012). Se ha reportado aumento en el crecimiento de crustáceos utilizando diferentes especies de algas y microalgas en la producción acuícola (PEÑA-RODRIGUEZ *et al.*, 2010; CRUZ-SUAREZ *et al.*, 2010; GHARIBI *et al.*, 2015), al igual que ocurrió durante el presente ejercicio, donde también se observaron mejores tasas de crecimiento de los camarones en sistemas de inclusión de microalgas en comparación con el sistema de producción de camarón tradicional.

El nivel de proteína en el músculo de los camarones alimentados con la microalga filtrada *A. platensis* fue superior al de camarones alimentados únicamente con balanceado comercial. Esto probablemente se debió a que *A. platensis*, contribuyó como suplemento proteico para los camarones. De acuerdo con HENRIKSON (2009) esta microalga no posee pared celular, lo que facilita la digestión de la misma, facilitando el crecimiento de los animales que son alimentados con esta microalga. Estos resultados coinciden con los presentados por ABDEL-TAWWAB y AHMAD (2009), que también obtuvieron mayor contenido proteico en el músculo de Tilapia del Nilo alimentada con *A. platensis*. Esta acumulación de proteína en el músculo de los animales alimentados con microalga fresca confirma que la oferta de mayor cantidad de proteína digestible ocasiona un mejor desempeño zootécnico de los organismos.

Debido a que la microalga *A. platensis* tiene alto valor nutricional y antioxidante, contribuye en la mejora de la salud de peces y camarones (WATANUKI *et al.*, 2006; LIN *et al.*, 2010; TAYAG *et al.*, 2010; MACIAS-SANCHO *et al.*, 2014). La actividad inmunoestimulante de *A. platensis* probablemente tuvo influencia sobre los parámetros inmunológicos de *L. vannamei* al final del experimento.

El nivel de proteína en la hemolinfa puede servir

como indicador de la calidad de la dieta (CEDEÑO *et al.*, 2000; PASCUAL *et al.*, 2003; PÉREZ-JAR, de la condición nutricional y de la capacidad de adaptabilidad (LORENZON *et al.*, 2011), del estado fisiológico de los crustáceos (VELURTAS *et al.*, 2011) y en general del estado de salud (PERAZZOLO *et al.*, 2002; RUBIO-GASTÉLUM *et al.*, 2014). RACOTTA y PALACIOS (1998), PERAZZOLO *et al.* (2002) y LIN *et al.* (2015) reportaron la disminución de los niveles de proteína en la hemolinfa durante periodos de estrés agudo en el camarón blanco del Pacífico. Al final del experimento encontramos valores mayores de concentración de proteína en la hemolinfa en los camarones que recibieron microalga filtrada como suplemento que para los camarones del tratamiento control. Esto se debe al mayor aporte proteico por parte de la microalga generando mayor crecimiento y mejor respuesta inmunológica.

Según PASCUAL *et al.* (2004), utilizar alimentos con bajo contenido proteico durante la producción de *L. vannamei* provoca aumento de la tasa de respiración metabólica, reducción de: crecimiento, capacidad inmunológica, concentración de hemocitos y de la capacidad fagocítica de los mismos. Nuestros resultados corroboran los resultados de ANAND *et al.* (2015) y KUMAR *et al.* (2015), donde la inclusión de alimentos con alto contenido proteico aumentó los niveles de proteína en la hemolinfa.

Al mismo tiempo, la cantidad de hemocitos mostraron diferencia significativa entre los tratamientos, esta diferencia refleja un mejor estado inmunológico de los camarones que fueron alimentados con *A. platensis* como suplemento alimenticio, debido a las características inmunestimulantes que posee esta microalga (MACIAS SANCHO *et al.*, 2014). Los Hg son las células responsables de originar y almacenar peneidinas (DESTOUMIEUX *et al.*, 2000), además de encargarse de la actividad fagocítica contra microorganismos y de formar nódulos microbicidas (HOSE *et al.*, 1990; GARGIONI y BARRACCO, 1998; VAN DE BRAAK *et al.*, 2002; BARRACCO *et al.*, 2008). La cantidad de hemocitos encontrados en la hemolinfa puede variar en respuesta a infecciones, estrés ambiental y actividad endócrina durante los procesos de muda (SMITH y RATCLIFFE, 1978; PERSSON *et al.*, 1987; SMITH y JOHNSTON, 1992; JOHANSSON *et al.*, 2000). LIU y CHEN (2004) percibieron restricción en la respuesta inmune del camarón blanco cuando este fue expuesto a altas concentraciones de amonio (5-20  $\text{NH}_4^+$  mg  $\text{L}^{-1}$ ). Los

mismos, encontraron una reducción en la capacidad fagocítica de los hemocitos de los camarones en condiciones de mayor concentración de amonio, pero no se obtuvieron diferencias en la cantidad de hemocitos granulados.

Durante el período experimental, los altos niveles de amonio en el agua y la alta densidad de siembra de camarones provocaron un aumento en los valores de Hg, coincidiendo con los resultados obtenidos por TAYAG *et al.* (2010) y LIN *et al.* (2010), donde aumentó el número de Hg en camarones mantenidos en agua utilizada para cultivar *A. platensis* y posteriormente enfrentados a diferentes tipos de estrés.

Frente a condiciones específicas como la contaminación por metales o factores ambientales adversos, ocurre un aumento de la apoptosis en los organismos acuáticos (OBERHAMMER, 1993). La apoptosis es el principal proceso de respuesta inmunológica al retirar células dañadas, infectadas y senescentes que no han sido inflamadas para poder mantener la homeostasis inmunológica (TERAHARA y TAKAHASHI, 2008). Los valores de apoptosis durante el presente experimento fueron mayores en el tratamiento donde se suplementó microalga, indicando que estos camarones estaban más aptos inmunológicamente bajo las condiciones ambientales ocurridas, que los alimentados únicamente con balanceado. Estos resultados confirman lo observado al respecto de la concentración de hemocitos en este estudio. CHANG *et al.* (2009), XIAN *et al.* (2012) FAN *et al.* (2013) y LI *et al.* (2014) también encontraron valores altos de apoptosis en grupos de camarones que enfrentaron grandes variaciones de temperatura, siendo la apoptosis la respuesta propia del sistema de defensa del camarón para disminuir los efectos ocasionados por diferentes situaciones extremas de cultivo.

Sin embargo, MACIAS-SANCHO *et al.* (2014) encontraron reducción de los niveles apoptóticos para los camarones alimentados con dietas con altos niveles de sustitución de harina de pescado por harina de *A. platensis*, destacando que estos valores de apoptosis en la hemolinfa ocurrieron bajo situaciones de cultivo óptimas. Altos valores de apoptosis pueden estar conectados a la velocidad de respuesta frente a posibles invasiones o situaciones de estrés. Los animales que ingieren alimentos inmunoestimulantes aumentan su resistencia, ya que consiguen un aumento en la renovación celular de sus defensas en situaciones de estrés, como las altas densidades de cultivo.

## CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este estudio podemos inferir que incluir la microalga *A. platensis* como suplemento alimenticio mejora el desempeño zootécnico de *L. vannamei* respecto a aquellos que no recibieron este suplemento. En relación al sistema inmunológico, los resultados permiten concluir que los camarones muestran mejoras en los parámetros inmunológicos como proteínas totales de la hemolinfa y hemocitos granulados cuando son alimentados con microalga *A. platensis*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento (MAPA), al Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CNPq) y a la Coordinación de Perfeccionamiento de Personal de Nivel Superior (CAPES). M.B. Tesser, L.H. Poersch, L.A. Romano y W. Wasielesky recibieron beca de investigación de productividad del CNPq.

## REFERENCIAS

- ABDEL-TAWWAB, M.; AHMAD, M.H. 2009 Live *Spirulina (Arthrospiraplatensis)* as a growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 40(9): 1037-1046.
- AMINOT, A.; CHAUSSEPIED, M. 1983 *Manuel des analyses chimiques en milieu marin*. CNEXO, Brest. 379 p.
- ANAND, P.S.S.; KOHLI, M.P.; DAM ROY, S.; SUNDARAY, J.K.; KUMAR, S.; SINHA, A.; PAILAN, G.H. 2015 Effect of dietary supplementation of periphyton on growth, immune response and metabolic enzyme activities in *Penaeus monodon*. *Aquaculture Research*, 46(9): 2277-2288.
- APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION). 1998 In: *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th edition. Washington, DC. 1193 p.
- ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). 2000 *Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analytical Chemists International*, 16th ed. AOAC International, Arlington, VA, USA.
- BARRACCO, M.A.; PERAZZOLO, L.M.; ROSA, R.D. 2008 Inmunología del Camarón. En: MORALES, V. y CUÉLLAR-ANJEL, J. *Guía Técnica-Patología e Inmunología de Camarones Peneidos*. Programa CYTED, Panamá. 169-264.
- BELAY, A.; KATO, T.; OTA, Y. 1996 *Spirulina (Arthrospira)*: potential application as an animal feed supplement. *Journal of Applied Phycology*, 8(4-5): 303-311.
- BENDSCHNEIDER, K.; ROBINSON, R.J. 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in seawater. *Journal of Marine Research*, 11(1): 87-96.
- BRADFORD, M.M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
- CEDEÑO, R.; VALENZUELA, E.; RODRÍGUEZ, J. 2000. Efectores inmunitarios como marcadores de deficiencias nutricionales en dietas para *Litopenaeus vannamei*. *Panorama Acuicola*, 5(1): 42- 44.
- CHANG, C.C.; YEH, M.S.; CHENG, W. 2009 Cold shock-induced norepinephrine triggers apoptosis of hemocytes via caspase-3 in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(6): 695-700.
- CHARRIAUT-MARLANGUE, C.; BEN-ARI, Y. 1995 A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport*, 7(1): 61-64.
- CHENG, W.; WANG, L.U.; CHEN, J.C. 2005 Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*, 250: 592-601.
- CHUNTAPA, B.; POWTONGSOOK, S.; MENASVETA, P. 2003 Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp culture tanks.

- Aquaculture*, 220(1): 355-366.
- CRUZ-SUÁREZ, L.E.; LEÓN, A.; PEÑA-RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ-PEÑA, G.; MOLL, B.; RICQUEMARIE, D. 2010 Shrimp/Ulva co-culture: a sustainable alternative to diminish the need for artificial feed and improve shrimp quality. *Aquaculture*, 301(1): 64-68.
- DALLE ZOTTE, A.; CULLERE, M.; SARTORI, A.; SZENDRÓ, Z.; KOVÁCS, M. GIACCONE, V.; DAL BOSCO, A. 2014 Dietary Spirulina (*Arthrospira platensis*) and Thyme (*Thymus vulgaris*) supplementation to growing rabbits: Effects on raw and cooked meat quality, nutrient true retention and oxidative stability. *Meat Science*, 98(2): 94-103.
- DESTOUMIEUX, D.; MUÑOZ, M.; COSSEAU, C.; RODRIGUEZ, J.; BULET, P.; COMPS, M.; BACHÈRE, E. 2000 Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *Journal of Cell Science*, 113(3): 461-469.
- FAN, L.F.; WANG, A.L.; WU, Y.X. 2013 Comparative proteomic identification of the hemocyte response to cold stress in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Proteomics* 80(2): 196-206.
- FURTADO, P.S.; POERSCH, L.H.; WASIELESKY, W. 2011 Effect of calcium hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT) systems. *Aquaculture*, 321(1): 130-135.
- GAMBOA-DELGADO, J. 2014 Nutritional role of natural productivity and formulated feed in semi-intensive shrimp farming as indicated by natural stable isotopes. *Reviews in Aquaculture*, 6(1): 36-47.
- GARGIONI, R.; BARRACCO, M.A. 1998 Hemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. *Journal of Morphology*, 236(3): 209-221.
- GHARIBI, M.R.; ATASHBAR, B.; AGH, N.; NEMATOLLAHI, M.; ARAMLI, M.S.; NOORI, A. 2015 Effect of concentration of the microalga *Dunaliella tertiolecta* on survival and growth of fairy shrimp, *Phallocryptus spinosa* Milne Edwards, 1840 (Crustacea: Anostraca). *Aquaculture Research*, 47(9): 2976-2982
- GE, H.; LI, J.; CHANG, Z.; CHEN, P.; SHEN, M.; ZHAO, F. 2016 Effect of microalgae with semi continuous harvesting on water quality and zootechnical performance of white shrimp
- GUILLARD, R.R. 1975 Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: *Culture of marine invertebrate animals*. Springer US. p. 29-60.
- HENRIKSON, R. 2009 Earth food *Spirulina*: How this remarkable Blue-green alga can transform your health and our planet. Enterprises Inc, Laguna Beach.USA. 180p.
- HOSE, J.E.; MARTIN, G.G.; GERARD, A.S. 1990 A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *Biological Bulletin*, 178(1): 33-45.
- JOHANSSON, M.W.; KEYSER, P.; SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. 2000 Crustacean hemocytes and hematopoiesis. *Aquaculture*, 191(1): 45-52.
- JORY, D.E.; CABRERA, T.R.; DUGGER, D.M.; FEGAN, D.; LEE, P.G.; LAWRENCE, A.L.; JACKSON, C.J.; MCINTOSH, R.P.; CASTAÑEDA, J. 2001 A global review of shrimp feed management: Status and perspectives. In: BROWDY, C.L. y JORY, D.E. *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society. p.104-152.
- KUMAR, S.; ANAND, P.S.; RAVICHANDRAN, P.; PANIGRAHI, A.; DAYAL, J.S.; RAJA, R. DEO, A.D.; GHOSHAL, T.K.; PONNIAH, A.G. 2015 Effect of periphyton on microbial dynamics, immune responses and growth performance in black tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius, 1798. *Indian Journal Fisheries*, 62(3): 67-74.
- LI, B.; XIAN, J.A.; GUO, H.; WANG, A.L.; MIAO, Y.T.; YE, J.M.; YE, C-X.; LIAO, S.A. 2014 Effect of temperature decrease on hemocyte apoptosis of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*, 22(2): 761-774.

- LIN, Y.C.; TAYAG, C.M.; HUANG, C.L.; TSUI, W.C.; CHEN, J.C. 2010 White shrimp *Litopenaeus vannamei* that had received the hot-water extract of *Spirulina platensis* showed earlier recovery in immunity and up-regulation of gene expressions after pH stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(6): 1092-1098.
- LIN, Y.C.; CHEN, J.C.; CHEN, Y.Y.; YEH, S.T.; CHEN, L.L.; HUANG, C.L.; HSIEH, J.F.; LI, C.C. 2015 Crowding of white shrimp *Litopenaeus vannamei* depresses their immunity to and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology*, 45(1): 104-111.
- LIU, C.H.; CHEN, J.C. 2004 Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 16(3): 321-334.
- LORENZON, S.; DE GUARRINI, S.; SMITH, V.J.; FERRERO, E.A.; 1999 Effects of LPS injection on circulating hemocytes in crustaceans in vivo. *Fish & Shellfish Immunology*, 9(1): 31-50.
- LORENZON, S.; MARTINIS, M.; FERRERO, E.A. 2011 Ecological relevance of hemolymph total protein concentration in seven unrelated crustacean species from different habitats measured predictively by a density-salinity refractometer. *Journal of Marine Biology*, 1(1): 1-7.
- MACIAS-SANCHO, J.; POERSCH, L.H.S.; BAUER, W.; ROMANO, L.A.; WASIELESKY JR, W.; TESSER, M.B. 2014 Fishmeal substitution with *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) in a practical diet for *Litopenaeus vannamei*: effects on growth and immunological parameters. *Aquaculture*, 426-427: 120-125.
- TAYAG, C.M.; LIN, Y.C.; LI, C.C.; LIOU, C.H.; CHEN, J.C. 2010 Administration of the hot-water extract of *Spirulina platensis* enhanced the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(5): 764-773.
- TERAHARA, K.; TAKAHASHI, K.G. 2008 Mechanisms and immunological roles of apoptosis in mollusks. *Current Pharmaceutical Design*, 14(2): 131-137.
- OBERHAMMER, F.; WILSON, J.W.; DIVE, C.; MORRIS, I.D.; HICKMAN, J.A.; WAKELING, A.E.; WALKER, P.R.; SIKORSKA, M. 1993 Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of inter nucleosomal fragmentation. *The EMBO Journal*, 12(9): 3679.
- PALLAORO, M.F.; VIEIRA, F.N.; HAYASHI, L. 2016 *Ulva lactuca* (*Chlorophyta Ulvales*) as co-feed for Pacific white shrimp. *Journal of Applied Phycology*, 28(6): 3659-3665.
- PASCUAL, C.; SÁNCHEZ, A.; SÁNCHEZ, A.; VARGAS-ALBORES, F.; LEMOULLAC, G.; ROSAS, C. 2003 Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture*, 218(1), 637-650.
- PASCUAL, C.; ZENTENO, E.; CUZON, G.; SÁNCHEZ, A.; GAXIOLA, G.; TABOADA, G.; SUAREZ, J.; MALDONADO, T.; ROSAS, C. 2004 *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary protein. *Aquaculture*, 236(1): 431-450.
- PEÑA-RODRÍGUEZ, A.; LEÓN, A.; MOLL, B.; TAPIA-SALAZAR, M.; NIETO-LÓPEZ, M. G.; VILLARREAL-CIVERA-CERECEDO CAVAZOS, D. A.; RICQUE-MARIE, D.; CRUZ-SUÁREZ, L.E. 2010 Uso de *Ulva clathrata* en la nutrición del camarón blanco: revisión. En: CRUZ-SUÁREZ, L.E.; RICQUE-MARIE, D.; TAPIA-SALAZAR, M.; OLEVERA-NOVA, M.A.; CIVERA CERECEDO R. *Avances en nutrición acuícola*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey. pp.700-712.
- PERAZZOLO, L.M.; GARGIONI, R.; OGLIARI, P.; BARRACCO, M.A. 2002 Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture*, 214(1): 19-33.
- PÉREZ-JAR, L.; RODRÍGUEZ-RAMOS, T.; RAMOS, L.; GUERRA-BORREGO, Y.; RACOTTA, I. S. 2006 Changes in metabolic and immunological

- variables of wild and pond-reared southern white shrimp *Litopenaeus schmitti* adult males during continuous reproductive activity. *Aquaculture*, 252(2), 591-597.
- PERSSON, M.; CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. 1987 The influence of hemocyte number on the resistance of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus* Dana, to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci*. *Journal of Fish Diseases*, 10(6): 471-477.
- RACOTTA, I.S.; PALACIOS, E. 1998 Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 29(3), 351-356.
- RODRÍGUEZ-RAMOS, T.; ESPINOSA, G.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; GOLLAS-GALVÁN, T.; MARRERO, J.; BORRELL, Y.; ALONSO, M.E.; BÉCQUER, U. ALONSO M. 2008 Effects of *Echerichia coli* lipopolysaccharides and dissolved ammonia on immune response in southern white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Aquaculture*, 274(1):118-125.
- RUBIO-GASTÉLUM, D.; VALENZUELA-QUIÑÓNEZ, W.; PARRA-BRACAMONTE, G.M.; SANTAMARIA-MIRANDA, A. 2014. Respuesta de metabolitos en hemolinfa y desempeño productivo del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* cultivado a altas densidades en laboratorio. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(3), 601-606.
- SÁNCHEZ, A.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, I.; CASAS-VALDEZ, M. 2012 The stable isotope of nitrogen in an experimental culture of *Ulva spp.* and its assimilation in the nutrition of white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Baja California Sur, Mexico. *Journal of Applied Phycology*, 24(3), 507-511.
- SMITH, V.J.; RATCLIFFE, N.A. 1978 Host defense reactions of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.); clearance and distribution of injected particles. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 58(2), 89-102.
- SMITH, V.J.; JOHNSTON, P.A. 1992 Differential hemotoxic effect of PCB congeners in the common shrimp, *Crangon crangon*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part-C. Toxicology and Pharmacology*, 101(3): 641-649.
- SOMBATJINDA, S.; WANTAWIN, C.; TECHKARNJANARUK, S.; WITHYACHUMNARNKUL, B.; RUENGJITCHATCHAWALYA, M. 2014 Water quality control in a closed re-circulating system of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) post larvae co-cultured with immobilized *Spirulina* mat. *Aquaculture International*, 22(3): 1181-1195.
- UNESCO. 1983 Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual and Guides, 12. Intergovernmental Oceanographic Commission, Paris, France.
- UTHAYAKUMAR, V.; VIDHYA, K.; CHANDIRASEKAR, R.; SREEDEVI, P.R.; MOHAN, K.; JAYAKUMAR, R.; SENTHILKUMAR, D.Y.; VENKATACHALAM, R. 2015 Effect of *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* and *Spirogyra maxima* on Population Growth, Egg Production and Nutritional Profiles in *Thermocyclops hyalinus*. *Global Veterinaria*, 15(6): 554-563.
- VAN DE BRAAK, C.B.T.; BOTTERBLOM, M.H.A.; TAVERNE, N.V.; VAN MUISWINKEL, W.B.; ROMBOUT, J.H.W.M.; VAN DER KNAAP, W.P.W. 2002 The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*, 13(4): 293-309.
- VAN WYK, P.; SCARPA, J. 1999 Water quality and management. En: VAN WYK, P.; DAVISHODGKINS, M.; LARAMORE, R.; MAIN, K.L.; MOUNTAIN, J.; SCARPA, J., *Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems*. Florida: Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, pp. 128-138.
- VELURTAS, S.M.; DÍAZ, A.C.; FERNÁNDEZ-GIMENEZ, A.V.; FENUCCI, J.L. 2011 Influence of dietary starch and cellulose levels on the metabolic profile and apparent digestibility in penaeoid shrimp/ Influencia del nivel de almidon y celulosa en la dieta sobre el perfil metabolico y digestibilidad aparente en camarones penaeideos. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 39(2): 214-224.
- WANG, W.; ZHANG, X. 2008 Comparison of antiviral efficiency of immune responses in

shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*, 25(5): 522–527.

WANG, X.W.; WANG, J.X. 2013 Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 39(1): 27-38.

WATANUKI, H.; OTA, K.; MALINA, A.C.; TASSAKKA, A.R.; KATO, T.; SAKAI, M. 2006 Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 258(1): 157–163.

WEIBEL, E.R. 1980 *Stereological Methods*, 2. Academic, London 253–257.

XIAN, J.A.; WANG, A.L.; HAO, X M.; MIAO, Y.T.; LI, B. YE, C. X. LIAO, S.A. 2012 In vitro toxicity of nitrite on hemocytes of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using flow cytometric analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 156(2): 75-79.

ZHANG, B.; LIN, W.; WANG, Y.; XU, R. 2010. Effects of artificial substrates on growth, spatial distribution and non-specific immunity factors of *Litopenaeus vannamei* in the intensive culture. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 10(4): 491–497.